

PCT/JP 2004/008784

16. 6. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

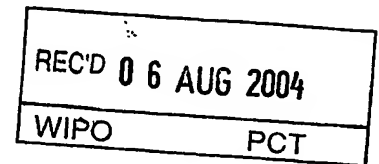
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 6 月 1 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 7 1 2 4 0  
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 7 1 2 4 0]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社産学連携機構九州

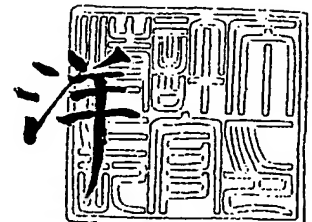


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 3 8 4 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0075

【提出日】 平成15年 6月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 16/00

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡市中央区薬院 4 - 1 8 - 2 6 - 1 0 0 4

    【氏名】 石川 文彦

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡市早良区百道浜 4 - 2 - 1 - 5 0 5

    【氏名】 原田 実根

【特許出願人】

    【識別番号】 800000035

    【氏名又は名称】 株式会社産学連携機構九州

【代理人】

    【識別番号】 100092783

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小林 浩

    【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

    【識別番号】 100095360

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

    【識別番号】 100093676

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100120134

【弁理士】

【氏名又は名称】 大森 規雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0307411

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト由来免疫担当細胞の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト由来造血前駆細胞が移植された新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）であって、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる前記動物。

【請求項 2】 請求項 1 記載の新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）を飼育してなる免疫不全哺乳動物。

【請求項 3】 造血前駆細胞が骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞であって、少なくとも CD34 陽性のものである請求項 1 又は 2 記載の動物。

【請求項 4】 免疫担当細胞が、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 1 又は 2 記載の動物。

【請求項 5】 生理活性物質がサイトカイン及び/又は免疫グロブリンである請求項 1 又は 2 記載の動物。

【請求項 6】 免疫不全哺乳動物が免疫不全マウスである請求項 1 又は 2 記載の動物。

【請求項 7】 ヒト由来造血前駆細胞を新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）に移植することを特徴とする、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる動物の作製方法。

【請求項 8】 造血前駆細胞が骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞であって、少なくとも CD34 陽性のものである請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 免疫担当細胞が、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】 生理活性物質がサイトカイン及び/又は免疫グロブリンである請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】 免疫不全哺乳動物が免疫不全マウスである請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の動物から免疫担当細胞を回収し、当該免疫担当細胞を抗原又は刺激物質の存在下で培養し、得られる

培養物からヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法。

【請求項13】 免疫担当細胞が、B細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞及びNK T細胞からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項12記載の方法。

【請求項14】 請求項1～5のいずれか1項に記載の動物を抗原又は刺激物質で免疫し、得られる免疫動物から当該ヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法。

【請求項15】 抗体の採取源が血漿又は血清である請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトリンパ系細胞と抗原提示細胞など免疫応答に必須なる種々の細胞の生体内増殖、及びヒト免疫系の再構築の技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒト幹細胞に関する研究は、生体内で測定することが重要であることから、免疫不全げっ歯類、又はヒツジ胎仔を用いた異種動物間移植に基づいて行われている。Scid-huアッセイは、McCuneらにより1988年に報告されており (Science 241: 1632-1639 (1988))、このアッセイはヒト細胞をCB17/SCIDマウスで検出した最初の例である。その後、ヒト造血細胞を移植するためのレシピエントとして、NOD/SCID、NOD/RAG-1null、beige/nude/scid又はNOD/SCID/ $\beta 2m$ null等の免疫不全マウスが多く用いられている。

【0003】

しかしながら、異種動物間の幹細胞移植のレシピエントとして使用されるマウスは、8～12週齢の成体マウスであることがほとんどである。また、通常の成体SCIDマウスを用いた場合において移植片を長期間維持させるには外来性サイトカインの投与が必要となり、T細胞を前駆細胞から分化させることが困難である。

【0004】

【非特許文献1】

McCune, J.M. et al., 1988. Science 241:1632-1639.

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 2】

Pflumio, F. et al., 1996. Blood 88:3731-3740.

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 3】

Shultz, L.D. et al., 2000. Journal of Immunology 164:2496-2507.

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 4】

Dao, M.A., and J.A. Nolte. 1998. International Journal of Molecular Medicine 1:257-264.

【 0 0 0 8 】

【非特許文献 5】

Kollet, O. et al., 2000. Blood 95:3102-3105.

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 6】

Flake, A.W. et al., 1986. Science 233:776-778.

【 0 0 1 0 】

【非特許文献 7】

Ito, M. et al., 2002. Blood 100:3175-3182.

【 0 0 1 1 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト免疫系を異種動物宿主に構築させ、免疫反応を自然又は人為的に起こすことにより、必要とされるヒト免疫細胞や、免疫グロブリン、サイトカイン等を産生させることを目的とする。

【 0 0 1 2 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、免疫不全動物に造血前駆細胞を移植することにより上記課題を解決し得ることを見出し、本発明を

完成するに至った。

【0013】

(1) すなわち、本発明は、ヒト由来造血前駆細胞が移植された新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）であって、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる前記動物である。また、本発明は、上記新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）を飼育してなる免疫不全哺乳動物である。

【0014】

上記造血前駆細胞としては、骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞であって、少なくともCD34陽性のもの（例えばCD34<sup>+</sup>細胞、あるいはCD3<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>、CD8<sup>-</sup>及びCD34<sup>+</sup>細胞のもの）が挙げられる。また、免疫担当細胞としてはB細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞及びNKT細胞からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。これら免疫担当細胞は、末梢血からレシピエントを殺すことなく採取可能であり、より多数の細胞、又は前記免疫担当細胞由来の生理活性物質（例えば免疫グロブリン、サイトカイン等）を精製する場合に、骨髓、脾臓、胸腺、リンパ節などを細胞源として利用することが可能である。免疫不全哺乳動物は免疫不全マウスであることが好ましい。

(2) さらに、本発明は、ヒト由来造血前駆細胞を新生児免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）に移植することを特徴とする、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる動物の作製方法である。造血前駆細胞としては、骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞であって、少なくともCD34陽性のものが挙げられ、免疫担当細胞としては、B細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞及びNKT細胞からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。また、生理活性物質としては、例えばサイトカイン及び/又は免疫グロブリンが挙げられる。免疫不全哺乳動物は免疫不全マウスであることが好ましい。

(3) さらに、本発明は、前記免疫不全哺乳動物から免疫担当細胞を回収し、当該免疫担当細胞を抗原又は適切な刺激物質の存在下で培養し、得られる培養物からヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法である。免疫担当

細胞としては、B細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞及びNKT細胞からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。

(4) さらに、本発明は、前記免疫不全哺乳動物を抗原又は刺激物質で免疫し、得られる免疫動物から当該ヒト由来抗体を採取する免疫することを特徴とする前記抗体の製造方法である。抗体の採取源としては、例えば血漿又は血清が挙げられる。

#### 【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

本発明はヒトリンパ系細胞を異種哺乳動物の生体内で増殖させ、異種哺乳動物においてヒト免疫系を再構築させようとして完成されたものである。具体的には、ヒト由来の造血前駆細胞を新生児免疫不全哺乳動物（例えばSCIDマウス）に移植し、当該宿主内でヒト由来細胞を分化及び増殖させることを特徴とするものである。

##### 1. 新生児免疫不全哺乳動物

本発明において、ヒト由来の造血前駆細胞を移植するためのレシピエントとして使用される動物は、ヒトを除く免疫不全哺乳動物であって生後7日以内、好ましくは生後2日以内の新生児である。

#### 【0017】

哺乳動物としては、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモットなどが挙げられる。モデル動物が豊富であり、系統が確立されている点で免疫不全マウスであることが好ましい。免疫不全マウスとは、T細胞及びB細胞の生産能を欠く重症複合免疫不全マウス（SCIDマウス）を意味し、特に、NK細胞の活性を持たないSCID/NOD $\beta$ 2ミクログロブリンノックアウトマウス(NOD/SCID/B2M)やNOD/SCID/common  $\gamma$ -chainノックアウトマウスが好ましい。このSCIDマウスの新生児を使うと、マウス生体内にヒト由来免疫細胞及び造血細胞を高率に産生させることができる。上記SCIDマウスは市販されており(Jackson Laboratory)、当業者が容易に入手することが可能である。



## 2. 細胞の調製及び移植

移植の対象となる造血前駆細胞は、例えば臍帯血、骨髓、末梢血から得ることができる。

### 【0018】

臍帯血 (CB) 細胞は、臨床検体 (例えば臨床検査等が済んで細胞数の問題や家族歴の問題から廃棄の対象となった検体) を日本赤十字センター臍帯血バンクから得るか、あるいは細胞を購入することも可能である。また、骨髓細胞は、骨髓バンクから得ることも、骨髓穿刺によって採取された細胞、又はそのうち廃棄の対象となる細胞から得ることもできる。末梢血は、一般的血液検査に使用するために採取した血液又はその廃棄対象血液を使用することができる。また、末梢血中の幹細胞集団をより効率良く取るには、G-CSFにより骨髓中の幹細胞を動員させたあとに採取することも可能である。

### 【0019】

次に、単核細胞 (MNCs) を密度勾配遠心により上記細胞から単離する。

### 【0020】

本発明において移植に使用される細胞は、少なくともCD34陽性 (CD34+) を表す細胞、すなわち造血前駆細胞である。CD34+細胞は、試料を抗ヒトCD34ミクロビーズとともにインキュベートすることにより得ることができる。

### 【0021】

上記造血前駆細胞源となる試料中には、造血前駆細胞のほかにT細胞に分化した細胞が含まれている。そこで、そのようなT細胞を除去するために、T細胞マーカーに対する抗体を反応させることもできる。例えば、MNCsをマウス抗ヒトCD3、CD4及び/又はCD8抗体とともにインキュベートする。これを洗浄後、細胞をビーズ抗マウス免疫磁気ビーズとともにインキュベートし、未結合の細胞を回収する。CD3、CD4及びCD8はいずれもT細胞のマーカー (表面抗原) であるため、これらの抗原に対する抗体を用いて上記処理を行うことにより、T細胞が除去される。このようにして得られる前駆細胞の細胞表面抗原は、CD3陰性 (CD3-)、CD4陰性 (CD4-)、CD8陰性 (CD8-) である。次に、T細胞を除去した試料を抗ヒトCD34ミク

ロビーズとともにインキュベートする。この操作により、CD34+を表す造血前駆細胞を得ることができる。そして、濃縮されたCD34+細胞の純度が好ましくは90%以上となるように、細胞を磁気カラムにかける。

#### 【0022】

レシピエント動物を予め放射線全身照射した後、所定の量に調製した造血前駆細胞をレシピエント動物（NOD/SCID/B2Mマウス等）に移植する。移植する細胞数は、動物の種類に応じて適宜定めることができる。例えば、SCIDマウスをレシピエントとした場合において、造血細胞を移植するときは1匹あたり少なくとも $1 \times 10^3$ 個であり、上限は特に限定されるものではない。好ましくは、 $1 \times 10^3$ 個～ $1 \times 10^7$ 個の細胞を使用することができる。多数の細胞により、より高率なヒト細胞の分化が期待できる。

#### 【0023】

移植は、静脈経路が好ましいが、腹腔、心腔内、肝臓内移植であってもよい。静脈経路で移植する場合は、顔面静脈、尾静脈などから細胞を注入する。この場合、26～30ゲージ(G)の注射針（例えば29G）を用いればよい。例えば、T細胞が除去された $1 \times 10^5$ 個のCB細胞（CD3-CD4-CD8-CD34+）を静脈注射により、予め100cGyの全身照射を受けた新生児NOD/SCID/B2Mマウスに移植するのが望ましい。

#### 【0024】

細胞の移植後、無菌管理を十分に行いながら飼育する。「無菌管理」とは、感染症などの病原微生物や抗原物質を含まないように管理することを意味し、いわゆるSPF(Specific pathogen free)レベルの無菌室での飼育、放射線照射した餌（又は低分子化した餌）を給餌すること、あるいは滅菌水を与えることをいう。マウスの場合は、2週～16週、好ましくは3～4週の間、上記無菌管理下で飼育すれば、免疫細胞の回収又は免疫に用いることができる。本発明においては、このような飼育された動物も提供される。

#### 【0025】

上記の通り得られた動物の体内はドナー（ヒト）由来の免疫系が確立されており、ヒト由来の免疫担当細胞などを回収することができる。本発明において、「免疫担当細胞」（免疫細胞ともいう）とは、免疫応答を成立させる細胞を意味し

、抗体産生細胞又は造血細胞、具体的にはB細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞、NK T細胞などが挙げられる。

#### 【0026】

これらのヒト由来細胞のレシピエント由来の細胞に対する比率は、造血細胞については5～90%、好ましくは20～90%であり、抗体産生細胞については2～80%、好ましくは10～80%である。

#### 【0027】

上記免疫担当細胞は、ドナーであるヒト由来の細胞であり、これらの細胞から各種生理活性物質が産生される。単球や樹状細胞などが、主な抗原提示細胞 (Antigen-presenting cell) として機能する。生理活性物質としては、例えばサイトカイン、免疫グロブリンなどが挙げられる。サイトカインは、各種の血球細胞の増殖と分化を制御するタンパク質性の生理活性物質であり、インターロイキン (IL)、コロニー刺激因子 (CSF)、ケモカインなどを例示することができる。これらサイトカインの異常な分泌や制御の調節破綻が各種病態と密接に関連していることが近年示唆されている。また、これらの産生減少は重症感染症に対して一種の免疫不全状態を呈する可能性が高い。また、免疫グロブリンはIg抗体を含む構造的・機能的関連をもつタンパク質であり、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEがある。IgG及びIgAについては、それらのサブクラス (それぞれG1～G4、A1～A2) も存在し、上記免疫グロブリンに含まれる。

#### 【0028】

B細胞は表面または細胞内にIg受容体を発現するリンパ球であり、IgG、IgM、IgA、IgDなどの免疫グロブリン、あるいはIL-6などのサイトカインを産生する。T細胞は、免疫応答に関与するリンパ球であって胸腺で分化、成熟する細胞であり、IL-2～IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16などを産生する。樹状細胞は、免疫応答の開始時に補助細胞 (アクセサリー細胞) として働く樹状突起をもった細胞であり、クラスII 主要組織適合 (MHC) 抗原を発現してヘルパーT細胞への抗原提示細胞として機能する。NK (ナチュラルキラー) 細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などに対し、MHC抗原に拘束されずに細胞傷害活性を示す細胞である。NKT (ナチュラルキラーT) 細胞は、T細胞受容体及びNK細胞マーカー (例え

ばCD16、CD56)を併せ持つ細胞であり、 $\alpha$ ガラクトシルセラミド( $\alpha$ GalCer)と呼ばれる糖脂質の刺激によりIFN- $\gamma$ やIL-4を産生する。

### 3. キメラ現象の確認及び抗体の産生

ヒト由来細胞がレシピエント動物において発現していることの確認は、レシピエント動物の末梢血、骨髓細胞、その他免疫組織を採取して、これらがヒト由来のものであることを確認すればよい。

#### 【0029】

例えば、レシピエントを免疫不全マウスとした場合は、移植後3週から3箇月の間に、末梢血は眼窩後叢から、骨髓細胞は大腿骨と脛骨から採取する。また、脾臓、リンパ節及び胸腺を切除後、細片化し、分離した細胞をメッシュフィルターに通して単一細胞懸濁液を得る。これらの細胞をFACSCalibur又はFACSVantage (Becton Dickinson)を用いたヒトCD45(白血球共通抗原、造血系細胞の主要膜糖タンパク質)の発現解析により、ドナー由来の造血細胞であることを同定する。マウス抗ヒト抗体等により染色することも可能である。

#### 【0030】

また、本発明の動物は、ドナーであるヒト由来の免疫系が確立されている。従って、免疫担当細胞であるB細胞(抗体産生細胞)、B細胞を高率に含む脾臓細胞等を抗原又は適当な刺激物質で刺激することにより、ヒト由来抗体を産生させることができる。抗体の産生能の測定は、B細胞の表面抗原はCD19陽性(CD19+)を表すため、CD19+細胞におけるIgM、IgG、IgD及びIgAの発現をセルソーター等により解析する。

#### 【0031】

さらに、本発明の動物を所定の抗原又は適当な刺激物質で免疫し、得られる免疫細胞から抗体を採取することにより、ドナー(ヒト)由来の抗原特異的抗体を得ることができる。

#### 【0032】

抗原又は適当な刺激物質の動物1匹当たりの投与量は、マウスの場合、 $10\mu\text{g}$ ～ $1\text{mg}$ であり、アジュバントの有無によって適宜調節する。アジュバントとして

は、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、水酸化アルミニウム等が挙げられる。

#### 【0033】

抗原又は適当な刺激物質の種類は特に限定されるものではなく、タンパク質、ペプチド、レクチンなどが挙げられる。

#### 【0034】

投与部位は静脈内、皮下、足 (food pad) 又は腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは1~2週間間隔で、1~3回の免疫を行う。そして、最終免疫後約一週間から二週間後に血清又は血漿中の抗体価を測定し、抗血清又は抗血漿を得る。抗体価の測定は、酵素免疫測定法 (ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)、放射性免疫測定法 (RIA; radioimmuno assay) 等により行うことができる。

#### 【0035】

抗血清又は抗血漿から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより抗体を精製することができる。

### 4. その他のキメラ現象の試験

#### (1) 組織学的解析

レシピエントマウスを解剖後、組織を固定化又は凍結する。パラホルムアルデヒド固定化組織は、段階的な濃度のアルコールを用いて脱水し、パラフィンに埋め込むことが好ましい。ミクロトーム又はクライオスタット等を用いて切片を作製し、それぞれの切片について、通常の免疫組織染色を行うことができる。

#### 【0036】

#### (2) 蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) 法

FISH法とは、染色体の遺伝子座位を決める周知技術であり、蛍光物質などにて標識した一本鎖プローブDNAを染色体DNAの相補性部位でハイブリダイズさせ、特異的に求める細胞などの部位を顕微鏡下で同定するというものである。

## 【0037】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

## 【0038】

## 〔実施例1〕 免疫不全マウスへのヒト造血細胞の移植

臍帯血 (CB) 細胞を日本赤十字センター臍帯血バンクから得た。書面によるインフォームドコンセントを得た後に、廃棄対象となった臍帯血からCB細胞を採取した。単核細胞 (MNCs) を、密度勾配 (リンパ球分離培地、ICN Biomedicals) を用いて370×g、30分間の遠心によりCBから単離した。MNCsをマウス抗ヒトCD3、CD4、CD8抗体 (BD Immunocytometry) とともに、4℃で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞をビツジ抗マウス免疫磁気ビーズ (DYNAL) とともに4℃で30分間インキュベートし、未結合の細胞を回収した。CD34<sup>+</sup>集団を単離するために、T細胞除去試料を、抗ヒトCD34ミクロビーズ (Miltenyi Biotech) とともに40分間インキュベートした (製造者プロトコールにしたがった。)。細胞を磁気カラムに2回通した結果、濃縮されたCD34<sup>+</sup>細胞の純度は90%以上となった。

## 【0039】

上記のように調製したCB細胞 (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>、 $1 \times 10^5$ 個) を、予め100cGyの全身照射を受けた新生NOD/SCID/B2Mマウス (Jackson Laboratory) に静脈注射により移植し、ヒト由来免疫細胞を初めとするヒト免疫系が構築されたマウスを作製した。

## 〔実施例2〕 マウス生体内におけるヒト由来B系細胞の解析

マウス生体内におけるヒトリンパ細胞の再構築の有無を調べるため、ヒトCD45<sup>+</sup>細胞であってCD19<sup>+</sup>細胞 (B細胞) の移植レベルについて、多重造血組織解析を行った。

## 【0040】

移植後、飼育3箇月目のレシピエントマウスの骨髓 (BM)、脾臓、末梢血 (PB)

、リンパ節 (LN) の中にヒト由来B系細胞が存在するか否かを解析した。BM、脾臓、PB、LNを FITC結合免疫グロブリン及びPE結合CD19で染色した。

#### 【0041】

結果を図1に示す。図1において、aはBM、bは脾臓、cはPB、dはLNから採取した細胞のフローサイトメトリーである。各リンパ組織において、高レベルのヒトCD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞が同定された。図1a~dに示す各数値 (それぞれ64.6, 23.6, 50.1, 44.6) は、各組織から採取した細胞全体の中に占めるCD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞の比率 (%) を示す。

#### 【0042】

また、図1の下側16枚のパネルにおいて、1段目(e)、2段目(f)、3段目(g)、4段目(h)のパネルは、それぞれBM、脾臓、PB、LN由来の造血細胞を、FITC-結合IgM (1列目)、IgD (2列目)、IgG (3列目)、IgA (4列目) 及びPE-結合CD19抗体により染色したときの結果を示す。各パネル内の数値は、CD19<sup>+</sup>細胞の中の免疫グロブリンの各クラスを発現する細胞の比率 (%) を示す。例えばeの1列目の90.1は、IgMを発現する骨髄由来細胞の比率である。

#### 【0043】

これらの結果から、BM、脾臓、PB、LNの各組織において、ヒト由来免疫グロブリンが高率に発現していることが示された。

#### 【0044】

次に、マウスにおいて生着したヒトリンパ系細胞の抗原特異性応答を調べるため、実施例1で作製したマウスを100 $\mu$ gのオボアルブミン (OVA) で免疫し、OVA-特異的IgM及びIgGの存在をELISAにより解析した。レシピエントマウスの血漿を10倍 (IgM解析用) 又は3倍 (IgG解析用) に希釈し、各サンプルについて吸光度を測定した。また、レシピエントマウスからB細胞を採取し、RPMI/FCS (ウシ胎児血清) /Pokeweed mitogen培地で5日培養した。その後培養上清中の免疫グロブリンをELISAにより測定した。陰性対照として、ヒト血清中の免疫グロブリンを測定した。

#### 【0045】

結果を図2に示す。図2においてパネルaはIgM、パネルbはIgGについての結果

である。グラフは、左から血漿、培養上清、陰性対照 1（ヒト血清）、陰性対照 2（陰性対照 1 の血清の 1/10 量）を示す。図 2 より、抗原特異的 IgM 及び IgG が効率に産生されていることが示された。

### 【実施例 3】 B 系細胞の分化と成熟化

レシピエントマウスの末梢血（PB）、骨髓（BM）及び脾臓からセルソーターによりヒト CD19<sup>+</sup>細胞（B 細胞）を採取し、B 細胞による IgM、IgG、IgD 及び IgA の発現を調べた。CD19<sup>+</sup>細胞における IgM/IgD の表面発現は PB では 90.0%/54.0%、BM では 19.7%/3.4%、脾臓では 59.0%/22.7% であった。

#### 【0046】

脾臓細胞をさらにヤマゴボウマイトジェン（PWM）を用いて試験管内で 5 日間培養した。また、100  $\mu$ g/ml の OVA で免疫したレシピエントマウスも作製した。続いて、培養上清及び血漿中へのヒト免疫グロブリンの分泌を ELISA を用いて調べた（表 1）。PWM を用いた 5 日間培養の培地（上清）は、114 ng/ml ~ 19.8  $\mu$ g/ml の IgM、2.6 ~ 47.6 ng/ml の IgG、及び 1.9 ~ 5.7 ng/ml の IgA を含んでいた（表 1）。

#### 【0047】

【表 1】

表 1 ヒト免疫グロブリンの産生

試料	血漿／免疫原	IgM	IgG	IgA
1	血漿／OVA	225000	823	553
2	培地／OVA	19800	47.6	5.7
3	血漿	23000	13	40
4	培地	114	2.6	1.9
5	血漿	47700	4.1	10.3
6	血漿	17200	5	9.4

（産生量単位：ng/ml）

#### 【0048】

レシピエントマウスから採取した血漿は、17.2 ~ 225  $\mu$ g/ml の IgM、4.1 ~ 823 ng/ml の IgG、及び 9.4 ~ 553 ng/ml の IgA を含んでいた。

#### 【0049】



表1に示す通り、レシピエントマウスをOVAで免疫した場合、ヒトB細胞は、OVA特異的IgMを含めて、多量のIgM、IgG及びIgAを分泌した。従って、本実施例において、新生児NOD/SCID/B2Mマウスにおいて産生されるヒトB細胞は、成熟してヒト由来IgM及びIgDを産生し、さらに抗原特異的かつヒト由来のIgM、IgG及びIgAを産生する機能を有することが示された。

#### 【0050】

これらの知見から、本発明のマウスにより得られるB細胞は、ヒト抗体産生細胞として使用するに止まらず、重症感染症の病原微生物や腫瘍に対するヒト免疫グロブリン（モノクローナル抗体）を産生するため極めて有用である。

#### 〔実施例4〕 マウス生体内におけるヒト由来T系細胞の解析

本実施例では、レシピエントマウスのBM、脾臓及びPBにおけるヒトT細胞の存在（CD45及びCD3）についてフローサイトメトリー解析を行なった。

#### 【0051】

結果を図3に示す。図3a～cの各パネルはそれぞれBM(a)、脾臓(b)、PB(c)の解析結果である。T細胞は、B細胞と比較して少数ではあるが分化しており、レシピエントへの移植後3箇月目のCD3<sup>+</sup>細胞は、BMで0.17%、脾臓で1.44%、PBで1.8%であった。

#### 【0052】

HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>表現型を特徴とする抗原提示細胞（APCs）では、BMで1.09%（図3d）であった。なお、胸腺において、CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>のB細胞が同定された（図3e）。

#### 〔実施例5〕 リンパ系組織のFISH解析と免疫蛍光分析

in situでのヒトリンパ細胞の分布を調べるために、レシピエントマウスに由来する脾臓を用いて、ヒト及びマウス染色体について二重FISH解析を行なった。FISHは、常法に従った。

#### 【0053】

ヒトX染色体プローブを用いた実験から、FACS分析の結果に矛盾しない高頻度のヒト細胞が得られた。ヒト及びマウスX染色体を用いた二重FISH分析から、マ

ウス起源の間質細胞も、脾臓に存在することが明らかとなった（図4）。

ヒト細胞は、緑色のシグナル（ヒトX染色体）として同定された（図4a）。レシピエントマウス由来の脾臓細胞の一部は、マウス抗ヒトCD3で赤色に染色された（図4c）。図4bはパネルaとbを重ね合わせた図であり、青く染まっている箇所は核を示す。

#### 【0054】

レシピエントマウスは、移植前にはいずれの成熟リンパ細胞も欠いているが、ヒトCB由来T細胞除去CD34+細胞を移植することにより、マウス内でヒト由来リンパ系組織をうまく再構築することができた。

#### 【0055】

また、組織標本について免疫組織染色を行なった。マウスから採取した脾臓組織の免疫組織染色の結果を図4d及びeに示す。大多数の脾臓細胞は、抗ヒトIgM陽性（d）、抗ヒトIgD陽性（e）に赤く染色され、極めて高率にヒト由来脾臓細胞が生着していることが示された。さらに、脾臓組織をマウス抗ヒトCD3で染色した結果、脾臓の一部が抗ヒトCD3で陽性（赤色）に染色された（図4f）。そして、濾胞樹状細胞に対する特異抗体を用いて免疫染色を行うことにより、ヒトAPCsの存在も確認することができた（図4g）。

#### 【0056】

##### 【発明の効果】

本発明により、新生児免疫不全動物を用いたヒト由来免疫担当細胞の製造方法を提供することができる。本発明の新生児免疫不全動物は、その体内にヒト由来の免疫系を構築することができるため、リンパ系組織の機能解析及びB細胞を用いたヒト由来抗体の作製に有用である。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

レシピエントマウスにおけるヒトB細胞系（CD19+細胞）の再構築、及び各種ヒト免疫グロブリンの発現を示す図である。

##### 【図2】

OVA特異的IgMのELISAの結果を示す図である。

【図 3】

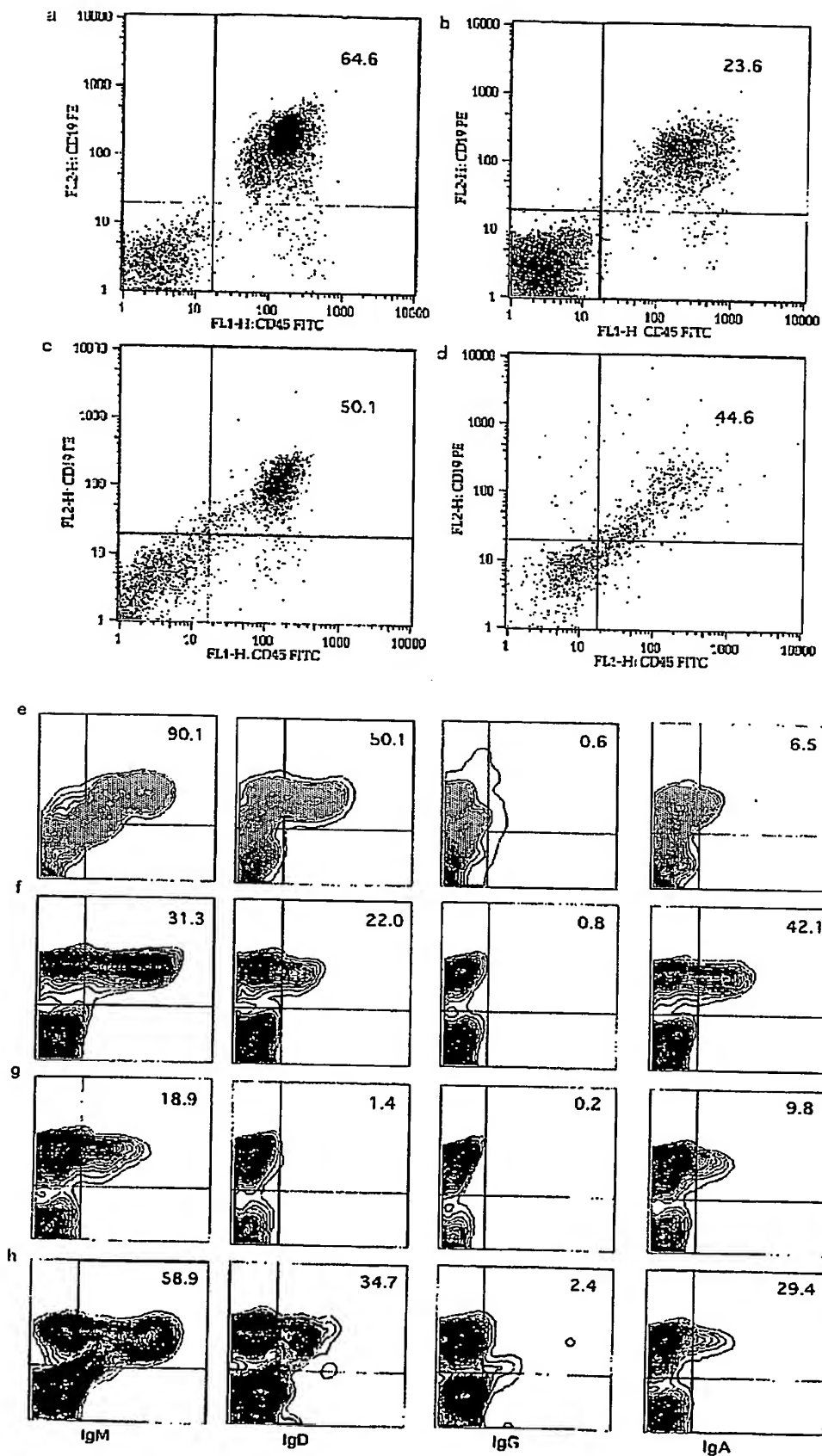
レシピエントマウスの骨髄、脾臓及び末梢血におけるヒトT細胞系の再構築を示す図である。

【図 4】

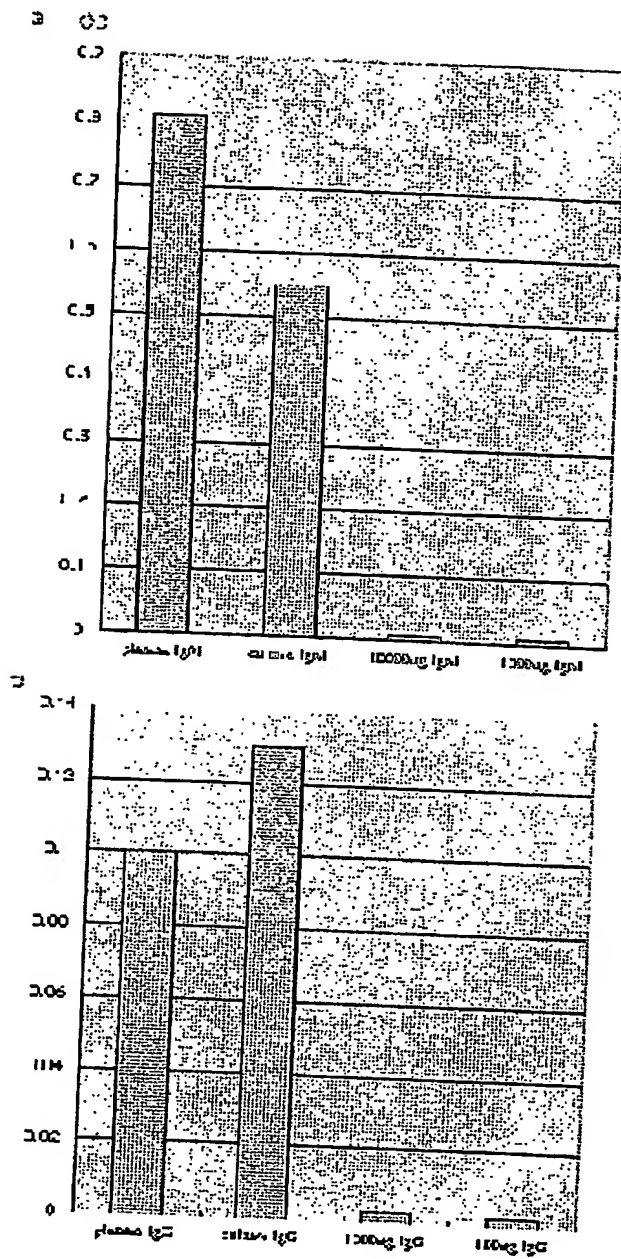
リンパ系組織のFISH解析及び免疫組織学的解析の結果を示す図である。

【書類名】 図面

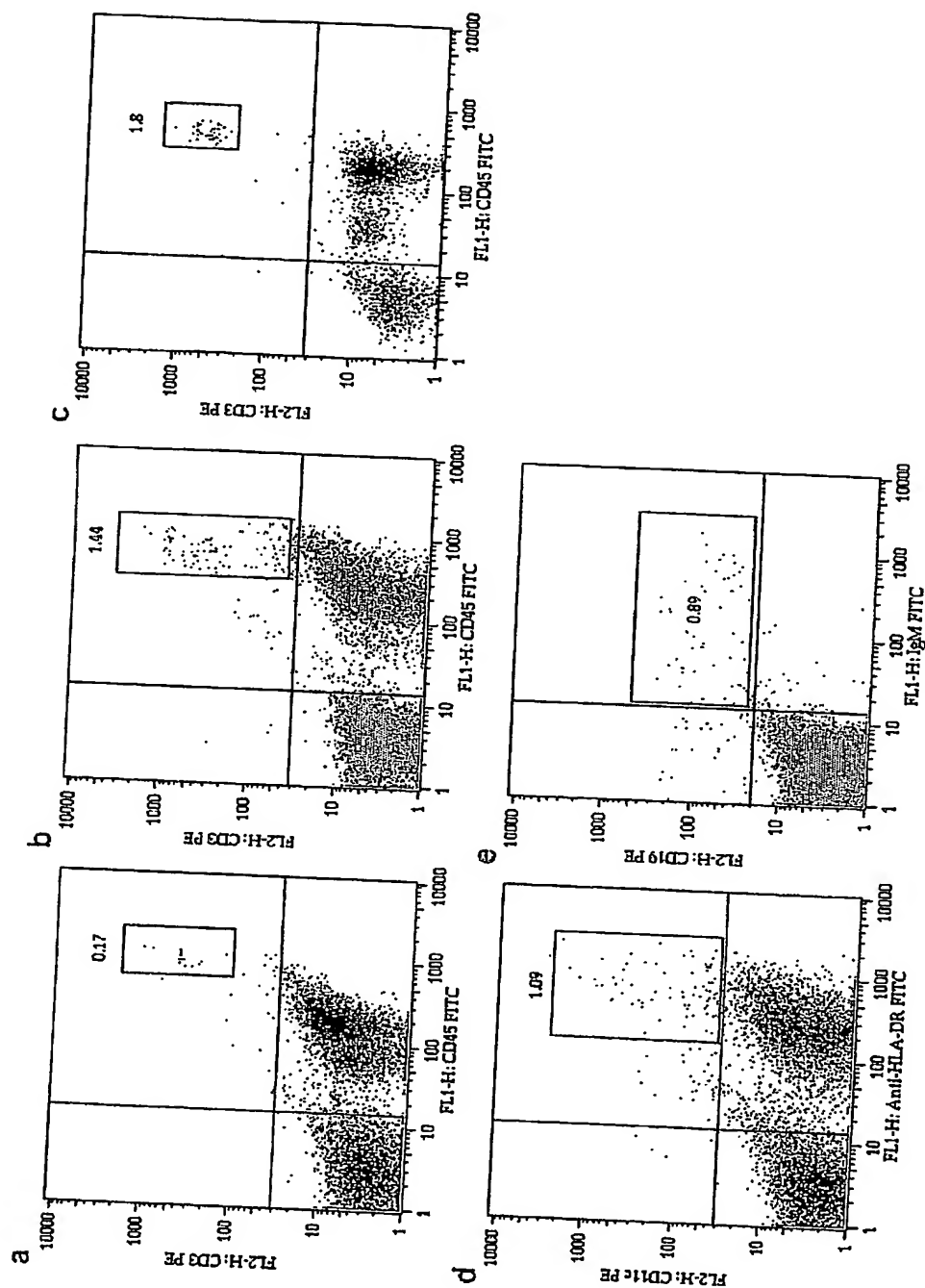
【図 1】



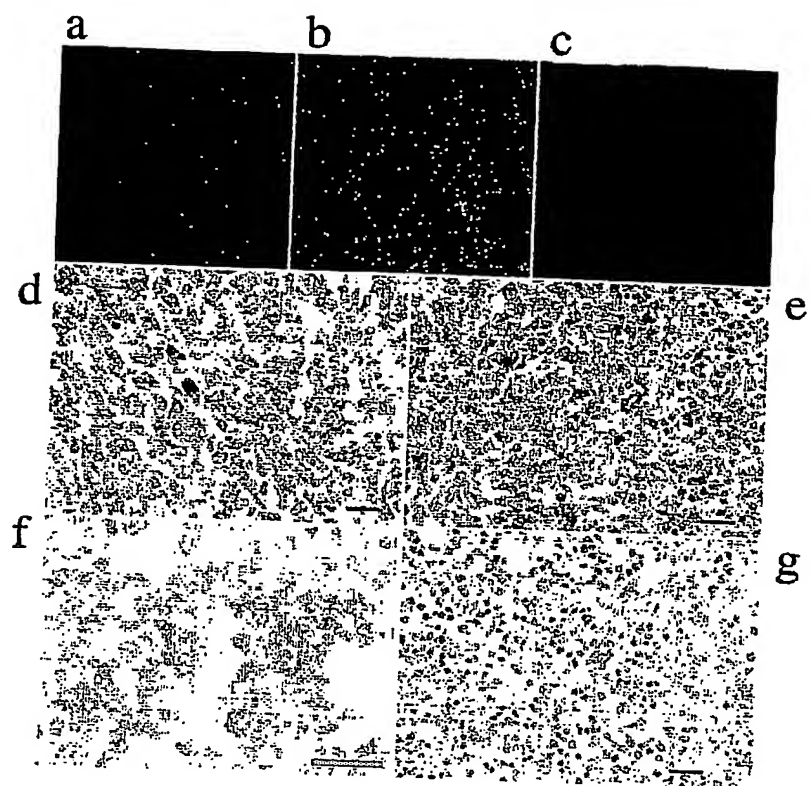
【図 2】



【図 3】



【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト由来リンパ系細胞を産生することができる免疫不全動物、及びヒト由来リンパ系細胞並びにヒト抗原特異的抗体産生の方法の提供。

【解決手段】 ヒト由来造血前駆細胞が移植された新生児免疫不全哺乳動物であって、当該ヒト由来の造血細胞又は免疫担当細胞を産生することができる前記動物、並びに、前記動物から免疫担当細胞を回収し、該免疫担当細胞を培養し、得られる培養物からヒト由来抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【選択図】 なし

特願 2003-171240

ページ: 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[800000035]

1. 変更年月日

2000年10月18日

[変更理由]

住所変更

住 所

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

氏 名

株式会社産学連携機構九州